Aus: Städt. Krankenhaus Neukölln
Direktor: Prof. Dr. med. K. Holldack

Die verminderte Stimulierbarkeit von Lymphozyten durch Phytohämagglutinin (PHA) bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie aus klinischer Sicht.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universiät Berlin

vorgelegt von
Jochen Ulrich Schulze Buschoff
Hamm / Westfalen

1974

Aus: Städt. Krankenhaus Neukölln
Direktor: Prof. Dr. med. K. Holldack

Die verminderte Stimulierbarkeit von Lymphozyten durch Phytohämagglutinin (PHA) bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie aus klinischer Sicht.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universiät Berlin

vorgelegt von
Jochen Ulrich Schulze Buschoff
Hamm / Westfalen

Referent: Frau Professor Dr. I. BOLL

Korreferent: Herr Professor Dr. BRÜCHER

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 16. März 1974

UNIV. LEIDEN BIBL.

Druck: Der Präsident der Freien Universität Berlin – Zentrale Universitätsdruckerei V aA 7, 1 Berlin 41

Die verminderte Stimulierbarkeit von Lymphozyten durch Phytohämagglutinin (PHA) bei Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie aus klinischer Sicht.

Phytohämagglutinin, ein Extrakt aus Phaseolus vulgaris (Phaseolin) besteht chemisch aus zwei Teilen: Einem Mucopolysaccharid und einem Protein, dem die Fähigkeit Erythrozyten zu agglutinieren zugeschrieben wird (21).
Keine Eigenschaft des PHA hat das Interesse der Wissenschaftler und Kliniker mehr angeregt als seine Einwirkung auf Lymphozyten.
Die Bedeutung von Lymphozytenkulturen mit dem Zusatz von PHA ist daran zu messen, daß die Anzahl der Untersucher, die darüber arbeiten, beinahe unübersehbar geworden ist. Sie versuchen oft mit den modernsten Mitteln der Zytologie und Immunologie ihren Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus der Lymphozyten-Stimulierung beizutragen.

PHA bewirkt bei Blutlymphozyten von normalen Personen:

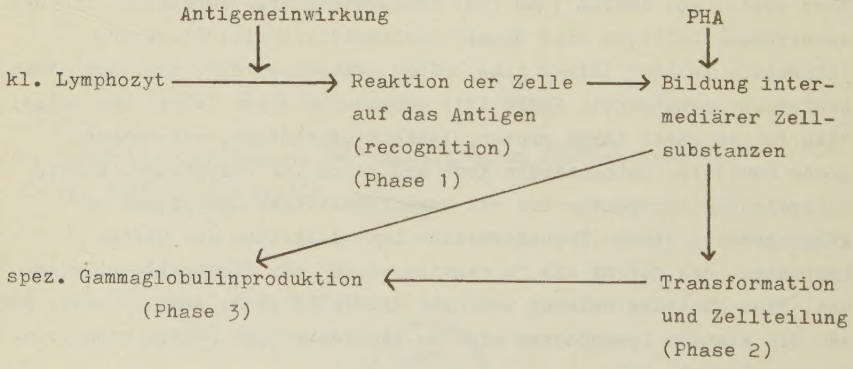
1.)Eine zuerst von NOWELL 1960 (39) beobachtete Transformation. Die neu entstandene Zellform wird bisher uneinheitlich als "Blasten", "blastoide Zellen" (blast like cells), "Stammzellen", oder als "Immunoblasten" bezeichnet. HEINE (31) beschreibt diese Zellen wie folgt: "Sie fallen durch ihren großen, leptochromatischen, oft mehrere große Nukleolen enthaltenden Kern und durch ihr basophiles, häufig unregelmäßig begrenztes und oft vakuolenhaltiges Zytoplasma auf". Ausgangszelle dieser Transformation ist sicherlich der kleine Lymphozyt, den YOFFEY als "a resting stage" der Stammzelle bezeichnet. Eine ähnliche Meinung vertritt CARSTAIRS (15), wenn er sagt, daß nur die kleinen Lymphozyten sich zu blastenartigen Zellen umwandeln, wenn auch nicht alle.
Normalerweise wandeln sich etwa 60-90% der Lymphozyten jedes gesunden Menschen innerhalb von 3 Tagen unter Einwirkung von PHA in vitro in solche Zellen um.

2.)Eine mitogene Wirkung wurde zuerst von HUNGERFORD und DONELLY 1959 (35) beschrieben: Die Zellen sind nun im Gegensatz zu den kleinen Lymphozyten zur Mitose fähig.

3.)Bei der Transformation steigt der DNS- und RNS-Gehalt des Zytoplasmas an. Die Zunahme der Ribosomen, die Entwicklung von Vesikeln und die Ausbildung des Golgiapparates sind als Zeichen für eine lebhafte Proteinsynthese und die Aktivierung der Zelle in Richtung Mitosebereitschaft aufzufassen (36,49).

PHA ist das Beispiel einer unspezifischen Stimulierung (GROPP und FISCHER 1964) (27), d.h., es braucht keine Sensibilisierung vorauszugehen wie etwa bei Tuberkulin, mit dem ein ähnlicher Effekt auf die Lymphozyten zu erzielen ist. PHA erreicht jedoch eine höhere Transformationsrate als die spezifischen Stimulantien (18,42,53). Die unterschiedliche Transformationsrate bei PHA und Stoffen mit spezifischer Stimulierung versuchen COULSEN und CHALMES (17) so zu erklären, daß die durch Antigene bewirkte Stimulierung nur auf eine beschränkte Anzahl von Lymphozyten trifft, die sich früher mit dem Antigen auseinandergesetzt haben, während das PHA diese Schranke (Phase 1) umgeht.

Abb. 1 Modellvorstellung der unspezifischen (PHA) und spezifischen (Antigene) Lymphozytenstimulierung (17).



DAMASHEK (19) unterscheidet zwei Erkrankungsgruppen des lymphatischen Systems: Die lymphoproliferativen Erkrankungen unter die die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) sowie die Lymphosarkomatose fallen und die retikuloproliferativen Erkrankungen mit Morbus Hodgkin und Sarkoidose

(M.Boeck). Bei beiden Gruppen findet er eine herabgesetzte Transformationsfähigkeit. Besonders bei CLL wurde sie von zahlreichen Autoren beschrieben (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, 16, 23, 28, 33, 34, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52).
Die Ergebnisse von BERNARD (11,12) lassen vermuten, daß die bei der CLL transformierten Zellen die übriggebliebenen "normalen lymphoiden Elemente" sind und die leukämischen Zellen zur Transformation unfähig sind.
Eine Reihe von Untersuchern nimmt auch normalerweise die gleichzeitige Existenz von zwei verschiedenen Lymphozytenclonen an (2, 7, 14, 23, 26, 54). ASTALDI (2,8) wirft die Frage auf, ob das Alter der Lymphozyten entscheidend sei. Der junge bzw. relativ junge Lymphozyt kann sich zur Stammzelle entwickeln, während der ältere diese Fähigkeit verloren hat.
GROPP (26) unterscheidet zwischen "suffizienten zu der typischen immuno- zytologischen Reaktion befähigte, offenbar kompetente Lymphozyten, die wahrscheinlich mehr oder minder bedeutsamen Restpopulationen normaler Lymphozyten angehören und in suffiziente, zu dieser Reaktion nicht befähigte Zellen, die den eigentlichen Leukämiezellen entsprechen dürften". (Ähnlich auch HEINE und STOBBE 1969) (30)

Die vorliegende Arbeit untersucht Kulturen von CLL-Patienten-Blut mit PHA Zusatz. Gesucht wurde ein Zusammenhang zwischen verminderter Stimulierbarkeit und klinischen Faktoren. Die Transformationsrate und die Anzahl der Mitosen wurde ermittelt durch Auszählen eines Differenzialzellbildes. Zu den transformierten Zellen wurden auch die Zellen gezählt, die in der Entwicklungsreihe der Lymphozyten im allgemeinen als Lymphoblasten (prolymphocytes) angesehen werden.

MATERIAL

Als Kontrolle wurden Kulturen angefertigt von drei Personen mit normalem Blutbild. Für die Hauptuntersuchung standen 17 Patienten zur Verfügung, bei denen die Diagnose CLL als gesichert angenommen wurde. Von diesen wurden insgesamt 42 Kulturen nach folgender Technik angefertigt:

TECHNIK (13)

"Blutkulturen mit Phytohämagglutininzusatz werden folgendermaßen hergestellt: In einer mit Heparin (Liquemin-Originallösung) befeuchteten 20-ml-Spritze wird Blut abgenommen und in einem 50-ml-Röhrchen für einige Stunden bei 37°C aufbewahrt. Das dann überstehende Plasma wird abpipettiert und auf 2000 Leukozyten/ml Kulturmedium eingestellt. Das leukozytenhaltige Plasma wird in einer entsprechenden Menge Eagle-Medium auf 10 ml aufgefüllt, mit 3 bis 4 Tropfen Phytohämagglutinin P der Firma Difco und 5 Tropfen einer 0,9-%-Kochsalzlösung, die auf 100 ml 20 mg Streptomycin und 100 mg Ampicillin enthält, versetzt. Dieser Kulturansatz wird in 25-ml-Kölbchen gegeben, um eine möglichst große Gasphase über der Flüssigkeitskultur zu erhalten, und bei 37°C 2 bis 8 Tage inkubiert. Entsprechend den vorausgegebenen Zeitabständen werden der Kultur Proben entnommen und bei 500 U 10 Min. zentrifugiert."
Das gewonnene Sediment wird auf Objektträgern ausgestrichen und nach Pappenheim gefärbt.
Bei allen Kulturen, in denen transformierte Zellen zu sehen waren, wurden durchschnittlich etwa 600 Zellen im Ausgangspräparat und nach 2, 3 und 5 Tagen differenziert, insgesamt ungefähr 28.000 Zellen. Differenziert wurde zwischen den Lymphozyten einerseits und "Transformierten" andererseits. Zu diesen wurden die typischen Immunoblasten, und da diese das Produkt eines Umwandlungsprozesses sind, auch die Zwischenstufen, die sogenannten "transitional cells", sowie die Lymphoblasten (prolymphocytes) gezählt.

ERGEBNISSE

Die zur Kontrolle von normalen Personen angesetzten Kulturen zeigten das beschriebene Wachstum zu den typischen Zellen der PHA-Kultur. Die Zellen traten mit einer Häufigkeit von 83% auf. Der Gipfel der Transformationsrate liegt am dritten Kulturtage. Zu diesem Zeitpunkt sind auch die meisten Mitosen zu sehen (2,6%).
Diese Werte entsprechen dem bisher beschriebenen.

Ein recht unterschiedliches Bild liefern die Kulturen vom Blut von CLL-Patienten (Tabelle1 Spalte6 und Abb.2). Die Transformationsrate reicht vom völligen Ausbleiben der Transformation bis zur Transformations-

rate von Gesunden (90%). Dem entspricht ein Ausbleiben der Mitosen und die größte Mitoserate von 5%. Unterschiedlich ist aber nicht nur die Häufigkeit der Transformation von Patient zu Patient, sondern auch von Kultur zu Kultur bei einigen Patienten, bei denen während ihrer Krankheit wiederholt Kulturen angefertigt wurden. Auch hier steht ein Ausbleiben jeglicher Transformation einer Transformationsrate von 90% gegenüber (z.B. Fall p). Von insgesamt 42 Kulturen zeigten 21 Kulturen eine Transformation zwischen 0,2 % und 90 % mit einem Mittelwert von 31 %. Der Mitoseindex lag im Mittel für diese bei 0,6 % (in überhaupt nur 5 Kulturen traten Mitosen auf). Bei den 21 Kulturen, bei denen eine Transformation ausblieb, wurden ohne Ausnahme keine Lymphozyten, sondern nur Zelldetritus gefunden.
Von den 17 untersuchten Patienten zeigten sich transformierte Zellen bei 3 Patienten nie, bei 8 Patienten in einem Teil der Versuche und bei 6 Patienten immer. Die durchschnittliche Krankheitsdauer betrug für die erste Gruppe 1 Jahr, für die zweite 4 Jahre und für die dritte Gruppe 7 Jahre.

Abb. 2 Transformierte Zellen bei allen Versuchen; jeder Punkt bedeutet die Transformationsrate eines Versuches in %

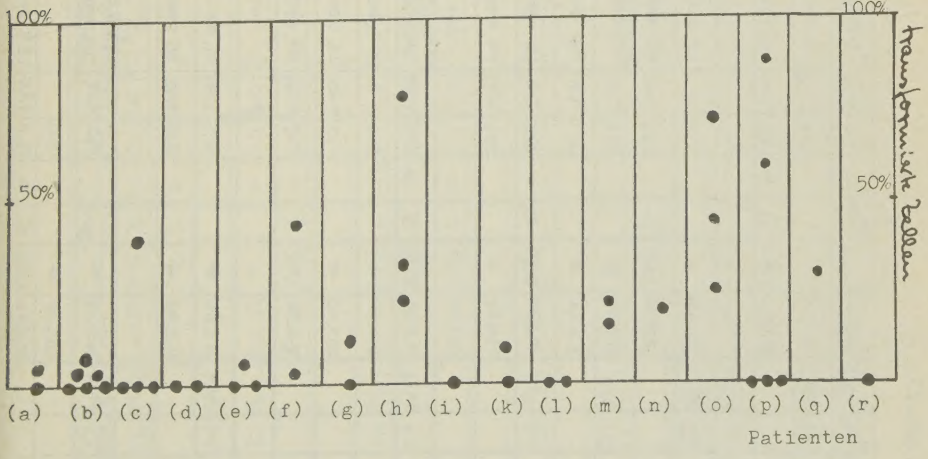


Tabelle 1

Patient	Kultur Nr.	2 Geschl.	3 Alter	4 Krank seit	5 Kultur am	6 Transf.	6a Kultur tag	7 MI	8 Hb g%	9 Ery $\times 10^6$/mm³	10 Leukozyt. /mm³	11 Ly %	Lymphoz. /mm³	13 KS	14 Thrombozyt. /mm³	15 BSG	16 γ-Glob.	17 Milz	18 Leber	19 Lk	20 Therapie	
B.O.(a)	1	♂	75	1962	15.1.71	Ø			10.0	3.5	11.000	48%	5.800					Ribo			Ø	
	2				27.5.71	3,6%	2.	Ø	9.1	3.05	15.000	81%	12.000	einig	69.000						Ø	
E.A.(b)	3	♀	52	1969	23.11.70	Ø			13.2	4.1	61.000	92%	56.000		67.000	6/16	12.5 rel% 0.78 g%	Ribo	Ø	ax. seit 1 Jahr inguin	Ø	
	4				8.12.70	Ø			13.2	4.1	61.000	92%	56.000		67.000			Ribo	Ø		Ø	
	5				9.3.71	Ø			12.2	3.9	76.000	95%	72.000		97.000	34/44		3QF	2QF		Ø	1
	6				5.5.71	Ø			12.5	3.7	96.000	96%	92.000	85%	27.000			3QF		re + li ax supraclav.	Ø	6
	7				17.5.71	8,8%	2.	Ø	12.5	3.9	101.000	95%	96.000	26%	34.000	3/10					Ø	1
	8				14.6.71	Ø			10.6	3.43	89.000	97%	86.000	55%	37.000			3-4QF			ab 18.5.71 Leukeran® 3 Tage 10 mg, dann 5 mg/die	
E.E.(c)	9	♀	65	1966	4.8.69	40%	5.	Ø	13.5	4.54	48.000 v.d. Therapie 29.000	70%	20.000	70%	174.000	40/70		Ø	1½QF		ab 18.4.68 Leukeran® 6–12 mg/d bis 1.7.68	
	10				5.u.6.9.69	Ø			14.8		18.300	89%	16.300	38%							Ø	
	11				20.3.70	Ø			13.2	4.25	28.500	86%	24.400	32%	204.000			Ø	1½QF	re. ax re. Hals	Ø	
	12				2.2.71	Ø			12.8	4.30	44.600	89%	40.000	33%	140.000		8.2 rel% 0.53 g%				Ø	
F.E.(d)	13	♂	79	1969	21.11.69	Ø			10.3	3.49	41.000	74%	30.000	20%	242.000						Ø	
	14				11.12.70	Ø			13.8	4.45	35.000	83%	29.000	20%	93.000			1QF	2QF		Ø	
J.(e)	15	♀	72	1969	31.3.70	Ø			13.2	4.14	123.000 6.69 163.000	97%	158.000			4/14		3QF	hand breit	ax. ing.	seit August 1969 2 mg Leukeran/d	
	16				20.5.70	Ø		'	13.0											″	bis Juni 70	
	17				24.8.70	5.5%	5.	Ø	13.0	4.25	189.000	96%	180.000		93.000	0/4		2QF	4QF	″		

1 Patient	Kult.-Nr.	2 Geschl.	3 Alter	4 Krankzeit	5 Kultur am	6 Transf.	6a Kultur Tag	7 M I	8 [illegible]	9 Ery $\times 10^6$/mm³	10 Leukozy. /mm³	11 Ly %	12 Lymphozyt. /mm³	13 KS	14 Thrombozyt. /mm³	15 BSG	16 γ-Glob.	17 Milz	18 Leber	19 LK	20 Therapie	
G.H. (f)	18	♂	56	1962	6.10.69	54%	3.	2.1	5.8	1.82	150.000 (62) 120.000 (66) 3.800	90%	3.400		16.000			3QF		Hals	1. Endoxan 12.62 2. Leukeran 66 3. Endoxan 67	3 Bluttransfusionen 22.9. u. 6.10.
	19				21.7.70	2%	3.	Ø	6.8	2.05	70.000	94%	66.000	66%	15.000	63/103	19 rel%	4QF	3QF	Hals ax, ing	4 Trenimon 69 5. Natulan 69 ab 12.69	† 18.8.70
																					Ultracorten 15 - 10 mg	
G.H. (g)	20	♀	77	1961	31.10.67	Ø		Ø	16.0	4.9	23.000	54%	12.400	10%	129.000			Ø	1QF		1961 Milz ex	
	21				28.5.68	12%	3.	Ø	16.0	4.8	16.000	50%	8.000	15%	132.000							
H.CH. (u)	22	♀	70	1954	25.7.68	24.2%	2.	0.8%	10.4	3.5	15.500	68%	10.500	94%	140.000						Ø	
	23				4.8.69	80%	5.	5%	13.4	4.49	21.300	65%	13.800	11%	188.000			Ø	Ø		Ø	
	24				28.12.70	34%	3.	Ø	14.5	4.4	19.800	77%	15.200	30%	77.000			Milz		ax re+li	Ø	
J.M. (i)	25	♀	65	1968	12.2.69	Ø			11.8	3.3	19.000	82%	15.500	40%	194.000	14/30	19.6 rel% 1,27 g%	3-4QF	Ø	ax	Endoxan 12 16.2 1x150 mg	
L.K. (b)	26	♂	73	1961	2. u. 8.10.68	Ø															TEM 12 ~ 2 Jahre 62	
	27				9.2.70	10%	3.	Ø	14.5	4.05	(96.000 6.69) 46.000	88%	40.500	17%	60.000						Leukeran 12 7.69 5 mg/d	
M.E. (l)	28	♂	66	70 Polygut.	26.10.70	0.2%	3.	Ø	10.0	3.07	114.000	93%	106.000		121.000	45/86	γ 35 rel% 5.71 g%	Milz	3QF	sterno-clav. ax.	ab 20.11.70 Leukeran 10 mg/d bis 10.12.72	= 210 mg
	29				14.12.70	Ø			6.6	1.91	88.000	98%	86.000	8%	11.000	114/142						
M.A. (m)	30	♂	72	1967	16.5.68	16%	2.	Ø	15.5	5.19	33.200	84%	28.000	36%	138.000	48/90	2.2 17% Hypogl.	Ø	Milz	Ø	Ø	
	31				23.7.68	22%	2.	Ø	15.5	5.19	33.200	84%	28.000	36%	138.000	48/90		Ø	Milz	Ø	Ø	

1 Patient	Kultur Nr.	2 Geschl.	3 Alter	4 Krankh. seit	5 Kultur am	6 Transf.	6a Kultur tag	7 MI	8 Hb g%	9 Ery $\times 10^6$/mm³	10 Leukozyt. mm³	11 Ly %	12 Lymphoz. mm³	13 KS	14 Thromboz. mm³	15 BSG	16 γ-Glob.	17 Milz	18 Leber	19 LK	20 Therapie	
M.W. (m)	32	♂	70	1966	9.10.70	20%	7.	ø	17.4	5.27	31.300	63%	13.500	8%	140.000	3/8	23 rel% 1.67 g%	1QF		überall etwas	ø	
P.K. (o)	33	♀	60	über 10 Jahre	9.10.69	73%	5.	2.1%	13.2	4.77	(76.000 v. Th.) 9.900	45%	5.400	15%	96.000		18.5 rel% 1.15 g%				68 Leukeran® 12 mg ab 9.10.69	Endoxan®
	34				29.10.69	45%	3	ø	12.8	4.7	12.500	54%	6.700	13%	96.000			ø	ø	ax++		
	35				17.7.70	25%	3.	ø	11.8	4.15	41.000	98%	40.000	38%								
R.A. (p)	36	♀	62	1968	6.8.69	59%	5.	ø	11.8	3.52	(113.000 68) 8.300	71%	5.900	5%	168.000						Leukeran ab 1968	∞
	37				2.2.70	ø			10.4	3.33	5.000	72%	3.600	12%	124.000			ø	2QF	clav. ax.	2–6 mg Leukeran® abgesetzt	
	38				10.3.70	ø			11.3	3.54	4.200	43%	1.800	2%	93.000							
	39				24.8.70	90%	3.	4%	14.7	4.10	7.500	42%	3.100	8%	85.000			ø				
	40				20.4.71	ø			12.0	3.86	60.000	90%	54.000	12%	141.000	5/7		ø	ø	ax. ing. clav.		
R.E. (q)	41	♀	76	1966	12.2.71	30%	3.	ø	14.6	4.57	31.700	84%	26.600	15%	108.000	25/55		ø	3QF	ø	ø	
U.L. (r)	42	♀	74	1969	27.2.70	ø			14.3	4.71	106.000	96%	103000	10%		6/14	Hyp. alb.	ø	5QF	ax. re.	ø	

MI = Mitoseindex

KS = Kernschatten

LK = Lymphknoten

Recht unterschiedlich sind auch die Ergebnisse bei 9 Patienten, die cytostatisch behandelt wurden.
Aus der Tabelle 2 ist die Anzahl der Patienten und der Kulturen und die mittlere Transformationsrate bei den Kulturen unter Behandlung mit Cytostatica zu ersehen.

Tab. 2

Cytostaticum	Anzahl der Patienten	Anzahl der Kulturen	% Transf.
Endoxan^R	2	4	37,7
Leukeran^R	5	7	10,0
Trenimon^R Natulan^R	1	1	54,0

Im folgenden sind die Ergebnisse von den Patienten, die therapiert wurden, aufgeführt:
Bei Patient b, der zunächst nicht behandelt war, zeigten 4 innerhalb eines halben Jahres gemachte Kulturen keine Blasten, bis dann doch 8,8 % Blasten auftraten. Eine dann wegen zunehmender Anämie einsetzende Leukeran-Therapie (3 Tage 10mg, dann 15mg tägl.) hatte nach einem Monat wieder ein Ausbleiben jeglicher Transformation zur Folge.

Patient c wurde 1 1/2 Jahre mit Leukeran (6-12mg/d) behandelt. Die Leukozytenzahl konnte dadurch von 49.000/mm^3 auf 29.000/mm^3 gesenkt werden. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit betrug zu diesem Zeitpunkt 40/70. Die PHA-Kultur ergab zunächst eine Blastenzahl von 40 %, während bei 4 weiteren Kulturen 1 Monat, 1/2 Jahr und 1 1/2 Jahre später keine Transformation beobachtet werden konnte.

Patient e wurde 3/4 Jahr cytostatisch behandelt (Leukeran^R 2mg). Eine Senkung der Leukozytenzahl (123.000/mm^3 vor der Kultur) wurde dadurch nicht erreicht. Die zu diesem Zeitpunkt angefertigten Kulturen zeigten ein negatives Ergebnis. 2 Monate nach einer Therapieunterbrechung zeigten sich jedoch 5,5 % Blasten.

Ein über 7 Jahre mit Endoxan^R, Leukeran^R, Trenimon^R, und Natulan^R behandelter Patient (f) zeigte 54 % Blasten in seiner Kultur, allerdings bei fast normaler absoluter Lymphozytenzahl, nur starker Verminderung von Segmentkernigen und großem Milztumor. In den letzten

2 Wochen vor der Kultur hatte der Patient 3 Bluttransfusionen erhalten (1,2 l Blut würden etwa 400 Ly./mm^3 entsprechen). 9 Monate später ergab die Kultur bei inzwischen eingeleiteter Prednisolon-Behandlung (15-10mg/die) über 7 Monate nur noch 2% Blasten. Die Leukozytenzahl war in diesem Zeitraum von 3.800/mm^3 wieder auf 70.000/mm^3 angestiegen. Der Patient starb 5 Wochen später im akuten Lymphoblastenschub.

Patient i bekam 10 Tage vor Kulturbeginn einmal 150mg Endoxan^R. Eine Transformation blieb aus.

2 Jahre lang wurde Patient k mit TEM^R behandelt. Die 4 Jahre nach Absetzen der Therapie gemachte Kultur blieb negativ. Eine später begonnene Therapie mit Leukeran^R (5mg/die) brachte 10 % Blasten. Durch die Therapie konnte die Leukozytenzahl von 96.000/mm^3 auf 46.000/mm^3 gesenkt werden.
Einen Abfall von 0,2 % auf 0 % stimulierter Zellen brachte eine einen Monat nach Therapiebeginn mit 10mg Leukeran^R (insgesamt 210mg) gemachte Kultur (l).

Nachdem ein Patient (o) zunächst mit Leukeran^R (12mg/die) behandelt worden war, sank die Transformationsrate von 73 % innerhalb von 3 Wochen auf 45 %. Unter Endoxan^R sank die Transformation 3/4 Jahr später auf 25 %. Dem gegenüber steht ein Anstieg der Lymphozytenzahl im Blut von 45 % auf 98 %. Wie auch bei Fall f ist bei einem Sinken der Transformationsrate ein Anstieg der absoluten Lymphozytenzahl zu beobachten.

Seit Erkennung der Krankheit wurde Patient p mit Leukeran^R (2-6mg/die) behandelt (mit einem Abfall der Leukozyten von 113.000/mm^3 auf 3.500/mm^3). 1 Jahr später zeigte die Kultur bei andauernder Behandlung 59 % blasten. 1/2 Jahr nach Absetzen der Therapie wurden keine Blasten, 1 Jahr später jedoch 90 % Blasten mit 4 % Mitosen gefunden. Nach einem weiteren halben Jahr blieb eine Transformation wieder aus. Hier möchte man vermuten, daß bei den Kulturen 37 und 38 technische Fehler die Ursache des Ausbleibens der Transformation waren.

Patient g, dem 6 Jahre vor der Kultur die Milz exstirpiert wurde, zeigte bei einem Anstieg der Transformationsrate von 0 % auf 12 %

einen Abfall der absoluten Lymphozytenzahl (von 12.000 Ly./mm^3 auf 8.000 Ly./mm^3).

7 Patienten erlangten während ihrer Kulturen keine Therapie:
Bei zweien zeigte sich nie eine Transformation (d und r).
Patient a hatte neben einem Ausbleiben der Transformation 4 Monate später eine gegenüber Gesunden stark verminderte Transformation (3,6 %) in seiner Kultur.
Eine Transformationsrate zwischen 16 % und 30 % war zu sehen bei 3 Patienten (m, n, q).
Nur bei Patient h war in einer Kultur eine Transformationsrate zu finden, die derjenigen von Gesunden entspricht (80 %).

DISKUSSION

Die in vitro Stimulierung mit PHA von Blutlymphozyten bei Patienten mit CLL bringt auch in unserem Untersuchungsgut in der überwiegenden Anzahl der Versuche die bekannte Verminderung der Transformationsfähigkeit dieser Zellen (in 35 von 42 Kulturen).
Aus der Tabelle 3 sind die Ergebnisse verschiedener Autoren bei Normalen und Patienten mit CLL zusammengetragen.

Tab. 3

Autor	Jahr	Diagnose	Patienten	transf.Schwankungsbreite
ASTALDI	1965	normal	10	45 - 85 %
HERSH	1965	normal	35	58 - 85 %
PÖSSNEROVA	1966	normal	6	69 - 92 %
HEINE	1969	normal	55	51 - 94 %
BERNARD	1964	CLL	15	0 - 23 %
WINTER	1964	CLL	7	0 - 24 %
QUAGLINO	1964	CLL	9	0 - 25 %
ASTALDI	1965	CLL	10	2 - 20 %
PÖSSNEROVA	1966	CLL	18	0 - 59 %
ELVES	1967	CLL	24	2 - 86 %
SCHEURLEN	1968	CLL	14	0 - 38 %
HEINE	1969	CLL	39	0 - 81 %
eig.Beob.	1971	CLL	17	0 - 90 %

Wie bei fast allen Untersuchern traten auch bei uns einige Fälle auf, bei denen die Transformationsquote über der Hälfte der Transformationsquote von normalen Personen lag.

Tab. 4 Anzahl der Fälle, bei denen die verschiedenen Autoren eine Transformationsquote fanden, die über der Hälfte der Transformationsquote von normalen Personen (40 %) lag.

Autor	Anzahl der CLL mit Transf. über 40 %	Kulturtage
BERNARD	1 von 15	bis 7 Tage
WINTER	0 von 7	bis 3 Tage
QUAGLINO	0 von 9	bis 3 Tage
ASTALDI	0 von 10	bis 3 Tage
PÖSSNEROVA	3 von 18	bis 4 Tage
ELVES	8 von 24	bis 3 Tage
SCHEURLEN	0 von 14	bis 3 Tage
HEINE	7 von 39	bis 3 Tage
eig.Beob.	7 von 42	bis 7 Tage

Von 21 eigenen Kulturen, bei denen transformierte Zellen auftraten, hatten 5 ihren höchsten Wert am 2. Tag (Mittelwert 14,9 %), 10 Kulturen am 3. Tag (30,2 %), 5 Kulturen am 5. Tag (51,5 %) und eine Kultur hatte ihren höchsten Wert am 7. Tag (20 %). Daraus ist zu ersehen, daß zwar die meisten Kulturen ihren höchsten Wert am 3. Kulturtage (wie bei unseren 3 Versuchen mit Gesunden) aufweisen, die Kulturen aber, die am 5. Tag die meisten Blasten zeigen, die höchste mittlere Transformationsrate aufweisen.
Zahlreiche Untersucher sind der Ansicht, daß es sich nicht um eine verminderte, sondern lediglich um eine verzögerte Antwort handelt (14, 16, 28, 29, 40, 48). Sie beschreiben bei Fällen von CLL eine verzögerte Antwort und sehen die höchste Anzahl blastoider Zellen am 7. Kulturtage (bes. BOURONCLE 14). Bei keinem dieser Autoren entsprechen die Transformationsquoten am 7. Tag bei CLL jedoch der auch von ihnen beschriebenen Transformationsquote am 3. Tag bei Normalen. Eine Übereinstimmung mit den vorgenannten Untersuchern konnten wir auf Grund unserer Versuche nicht erreichen.

Eine Hemmung der Stimulierbarkeit durch PHA in Kulturen mit Lymphozyten von normalen Personen wurde bisher beobachtet durch Zusatz von Chloramphenicol, Hydantoin (38) und Cytostatica (32). So sah HERSH (32) bei 20 Patienten, die wegen Malignomen cytostatisch behandelt wurden eine Reduzierung der Transformation ihrer Lymphozyten in der PHA-Kultur. Wurde mit massiven Dosen einer Kombination von Purinethol und Methotrexat mit oder ohne Prednisolon behandelt, so zeigte sich nach drei Tagen fast ein Erlöschen der Transformationsfähigkeit, jedoch schon vier Tage nach Absetzen eine wesentliche Erholung.

In welchem Zusammenhang stehen nun durch Chemotherapie behandelte CLL und das Verhalten der Lymphozyten in Bezug auf ihre Stimulierbarkeit? In der Beantwortung dieser Frage herrscht noch weitgehende Uneinigkeit (2, 8, 46, 52). Einige Autoren geben an, daß bei durch Chemotherapie behandelten CLL die Transformationsrate niedrig bleibt. So zeigte bei ELVES (23) der einzige Patient, der nicht behandelt war, hohe Blastenzahlen. In 14 Fällen von CLL fand SCHEURLEN (46) die höchste Transformationsrate (38 %) bei einem Patienten, der nur mit kleinen Steroiddosen behandelt wurde. (Auch SCHREK (48) fand eine verbesserte Transformationsrate nach Prednisolon). BOURONCLE (14) hingegen meint sogar die in vitro Stimulierung von Lymphozyten durch PHA als Maßstab für den therapeutischen Effekt von Medikamenten in der Behandlung der CLL ansehen zu können. Er fand eine Rückkehr zur normalen Transformation unter Leukeran^{R} (12-8mg/die) und Prednisontherapie (80mg/die). Ein klinischer und hämatologischer Rückgang der Befunde trat allerdings Monate vor der Rückkehr der Lymphozytentransformation zur Norm auf.

Von unseren Patienten wurden 9 cytostatisch behandelt (Tab. 2). Bei einigen von diesen wurden Kulturen angefertigt vor, während und nach der Therapie (b, c, e, f, i, k, l, o, p).

Abb. 3 Transformierte Zellen bei 27 Versuchen von unbehandelten CLL (die eingetragene Linie entspricht dem Mittelwert)

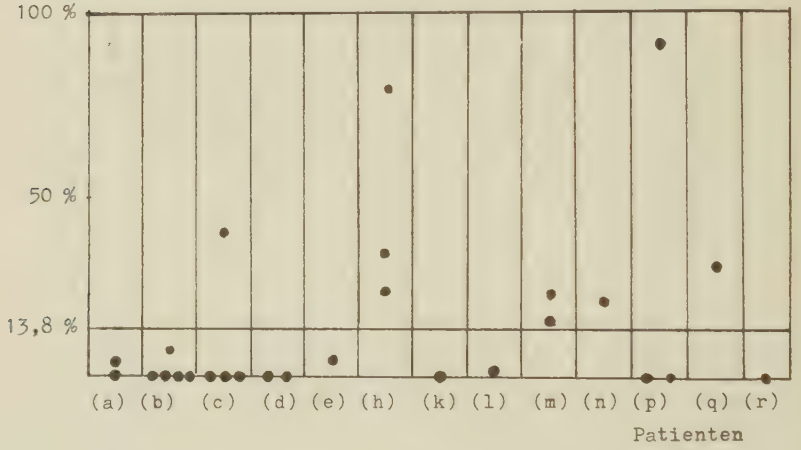
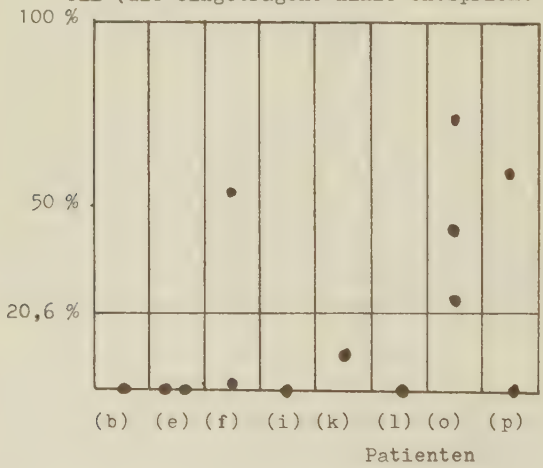


Abb. 4 Transformierte Zellen bei 13 Versuchen von behandelten CLL (die eingetragene Linie entspricht dem Mittelwert)



Obgleich sich die mittleren Transformationsraten von unbehandelten und behandelten Patienten (13,8 % und 20,6 %) unterscheiden, fällt eine Aussage über die Effektivität der cytostatischen Therapie anhand der PHA-Kultur schwer. (siehe die Abbildung 3 und 4)

Sowohl bei unbehandelten als auch bei behandelten Patienten findet man Kulturen mit hohen Transformationswerten. In den Tabellen 5 und 6 sind die Fälle von unbehandelten und behandelten CLL eingetragen, bei denen die Transformationsrate über dem Mittelwert aller unbehandelten bzw. behandelten Fälle liegt.

Tab. 5 5 Fälle von unbehandelten CLL, bei denen die Transformationsrate über dem Mittel aller unbehandelten Fälle (13,8 %) liegt

Patient	Kulturnr.	Leuko./mm^3	Lymphoz./mm^3	Transf.	BSG	Milzvergr.
c	9	29.000	20.000	40 %	40/70	0
h	22	15.500	10.500	24,2 %		0
	23	21.300	13.800	80 %		0
	24	19.800	15.200	34 %		Ribo
m	30	33.200	28.000	16 %	48/90	0
	31	33.200	28.000	22 %	48/90	0
n	32	31.300	13.500	20 %	3/8	1 QF
p	39	7.500	3.100	90 %		0
q	41	31.700	26.600	30 %	25/55	0

In der Tabelle 5 sind diese Fälle von unbehandelten CLL mit einer mittleren Transformationsrate von 39,6 % zusammengestellt. Im Vergleich mit der Tabelle 1 fällt auf, daß es sich hier um Versuche bei relativ niedrigen Leukozytenwerten, relativ niedrigen Lymphozytenzahlen und nicht bis kaum vergrößerten Milzen handelt.

Tab. 6 5 Fälle von behandelten CLL, bei denen die Transformationsrate über dem Mittelwert aller behandelten Fälle (20,6 %) liegt

Patient	Kulturnr.	Leuko./mm^3	Lymphoz./mm^3	Transf.	Milzvergr.
f	18	3.800	3.400	54 %	3 QF
o	33	9.900	5.400	73 %	0
	34	12.500	6.700	45 %	0
	35	41.000	40.000	25 %	0
p	36	8.300	5.900	59 %	0

Der Mittelwert für diese Kulturen beträgt 51,2 %. Er erreicht beinahe die Transformationsquote von gesunden Personen. Bei den in der Tabelle 6 zusammengestellten Fällen weist die mittlere Leukozytenzahl (15.100/mm^3) und die mittlere Lymphozytenzahl (12.300/mm^3) gegenüber den vergleichbaren Werten der Tabelle 5 (23.600 und 17.600/mm^3) auf eine bessere Transformation hin.

Die Frage nach einem die eingeschränkte Transformation verursachenden Zelldefekt oder Plasmafaktor beantwortete ASTALDI (6,8) folgendermaßen:

a) Das Plasma von CLL-Patienten enthält einen Faktor, der die Blastenbildung von Lymphozyten gesunder Personen unterdrückt, wenn diese mit PHA in Kultur stimuliert werden. Gegensätzlich geben einige Autoren (10,14,23,26,40,43,47) an, der Zusatz von Plasma von CLL-Patienten zu PHA-Kulturen von Gesunden hemme die Entwicklung von Blasten nicht. Übereinstimmend mit BACH, OPPENHEIM und SCHREK stellt ASTALDI jedoch fest, daß gewaschene Lymphozyten von CLL und das Plasma von Normalen auch niedrige Transformationsraten ergibt.

b) Die verminerte Antwort von CLL-Lymphozyten auf PHA wird von ASTALDI mit der Struktur der Zellen in Zusammenhang gebracht und auf die Tatsache zurückgeführt, daß die Lymphozyten bei CLL "in ihrer Struktur einen hemmenden Plasmafaktor enthalten oder produzieren".

c) Während der Koagulation von Erythrozyten geht der hemmende Plasmafaktor verloren.

d) Der Hemmfaktor im CLL-Plasma ist thermolabil (30 min bei 56°C), verschwindet während 2-wöchiger Lagerung bei 4°C und wird durch Bestrahlung der Kultur (500 r) zerstört.

Die therapeutische Maßnahme der massiven Bluttransfusion hatte bei dem Patienten f zu einer Zunahme gesunden = nicht leukämischen Blutes und somit zu einer erhöhten Anzahl zür Stimulation befähigter Lymphozyten geführt (54 % siehe dort). Die hohe Blastenzahl könnte bedeuten, daß zum Zeitpunkt der Kultur noch nicht alle gesunden Lymphozyten des Spenders durch leukämische Lymphozyten des Patienten ersetzt waren. Gleichzeitig würde die Konzentration eines im Plasma der CLL vorhandenen Hemmfaktors (falls existent) durch Zugabe gesunden Plasmas herabgesetzt

und seine Wirkung auf die gesunden Lymphozyten vermindert. Die niedrige Transformationsquote von 2 % 9 Monate später wäre dann so zu erklären, daß zu diesem Zeitpunkt die Wirkung der Bluttransfusionen wieder verlorengegangen ist.
Von OSGOOD (41) und EVERETT (24) wird angenommen, daß es zwei Arten von Lymphozyten gibt, die sich in Bezug auf ihre Transformierbarkeit unterscheiden. Sie führen dies auf Unterschiede in der Kinetik der Lymphozyten zurück. So unterscheiden sie zwischen den Lymphozyten des Thymus, Knochenmark und den ursprünglichen Zentren der Lymphfollikel und denen lokalisiert rund um die ursprünglichen Lymphfollikel-Zentren, im Rückenmark und in der Pulpa von Lymphknoten und Milz. Die letzteren machen die Mehrheit der peripheren Blut-Lymphozyten aus und diese scheinen auch die immunologisch-kompetenten Zellen zu sein. Sie scheinen zu der Art von Lymphozyten zu gehören, die sich in Kulturen mit dem PHA als immunologischem Agens in die basophilen Stammzellen nach LENNERT entwickeln. So könnten es in Fällen von CLL die Art von Lymphozyten sein, die als immunologisch-inkompetent gelten, die normalerweise im Thymus, dem Knochenmark und den ursprünglichen Lymphzentren wachsen und nur bei CLL im Blut vorherrschen.

Die Milz als Bildungsorgan von immunologisch-kompetenten Zellen, die zur Blastenbildung befähigt sind, ist typischerweise bei CLL vergrößert. Nur wenige Patienten gibt es, die keine vergrößerte Milz haben, obwohl ihr Blutbild und Sternalpunktat eindeutig auf eine Lymphadenose hinweisen. Dabei sind aber die CLL ohne tastbaren Milztumor sicher die "leichteren" Erkrankungen.

In den folgenden Abbildungen ist die Transformationsquote eingetragen in Bezug auf eine nicht tastbare bzw. vergrößerte Milz.

Abb. 5 Transformation bei nicht tastbarer Milz (die eingetragene Linie entspricht dem Mittelwert)

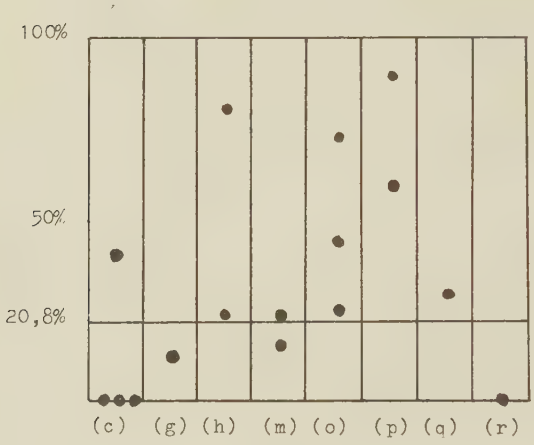
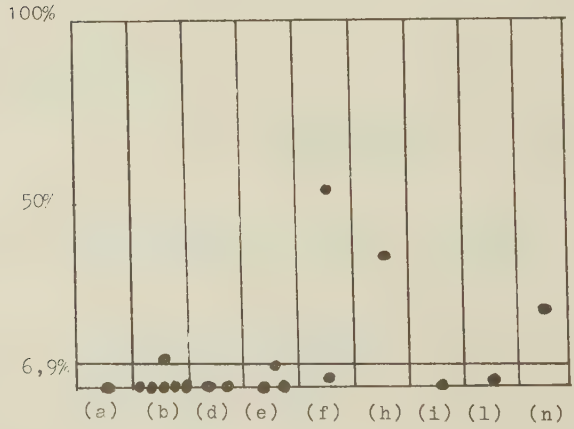


Abb. 6 Transformation bei vergrößerter Milz (die eingetragene Linie entspricht dem Mittelwert)



In der Unterscheidung der Abbildungen 5 und 6 ist zu erkennen, daß aus den Kulturen, bei denen die Patienten eine vergrößerte Milz hatten, die mittlere Transformationsrate mit 6,9% verglichen mit der Transformationsrate ohne Vergrößerung der Milz mit 20,8% niedriger war. Nimmt man die Milz als Bildungsorgan von immunologisch-kompetenten Lymphozyten an, so müßte bei CLL die vergrößerte Milz in mehr oder weniger starkem Maße zur Bildung von immunologisch-inkompetenten=leukämischen=nicht stimulierbaren Lymphozyten übergegangen sein. Dies könnte (allmählich?) zu einem überwiegen dieser Zellen gegenüber den normalen Lymphozyten führen, was die niedrige Transformationsrate bestätigt.

Eine Rückkehr zur normalen Transformation erreichte ASTALDI (7) bei zwei Patienten mit CLL durch Milzbestrahlung mit 400 bzw. 480 R. Vor der Milzbestrahlung waren nur 9% bzw. 11% Blasten vorhanden, während sie nach der Bestrahlung 68% und 78% erreichten. Bei der CLL waren periphere Lymphozyten nach einer Milzbestrahlung in den PHA-Kulturen im gleichen Prozentsatz transformierbar wie Lymphozyten aus dem peripheren Blut von gesunden Personen. 6 Wochen nach der Bestrahlung trat jedoch ein Rückgang zu niedrigen Werten wie vor der Bestrahlung auf. Hier stellt sich die Frage nach einem Zusammenhang zwischen der Reaktionsfähigkeit der leukämischen Zellen und der Abnahme der Blutleukozyten nach Milzbestrahlung (über den Zusammenhang zwischen der Anzahl der Leukozyten und der Stimulierbarkeit später). Es wäre möglich, daß durch die Bestrahlung die nicht reaktionsfähigen Lymphozyten zerstört werden, während die anderen erhalten bleiben oder sich vermehren. Es zeigte sich jedoch, daß einige Zeit nach der Bestrahlung die Reaktionsfähigkeit wieder verloren geht, während die Leukozytenzahlen weiter niedrig bleiben. Die Bestrahlung der Wirbel (7), von Rückenmark, Rippen und zervikalen Lymphknoten (8) hatte keinen Einfluß (zu geringer Anteil am gesamten lymphatischen Gewebe?). Ausgehend von der Annahme, die Milz beherberge bei CLL neben immunologisch-kompetenten auch inkompetente Zellen, so müßte bei einer Milzexstirpation der Anteil der zur Blastenbildung befähigten Lymphozyten zunehmen und daraus eine Verbesserung der Transformation resultieren. Dieser Fall trat bei Patient g ein (wenn auch nach verhältnismäßig

langer Zeit erst Kulturen durchgeführt wurden). Bei dem Patienten g, bei dem die Milzexstirpation im gleichen Jahr der Krankheitserkennung (=Krankheitsbeginn?) vorgenommen worden war, zeigte sich 6 Jahre später in denen keine Therapie stattgefunden hatte, bei relativ niedrigen Blut-Leukozytenwerten ein Ausbleiben jeglicher Transformation. Ein halbes Jahr später wurden bei noch tieferen Leukozytenwerten (16.000) 12% blastoide Zellen gefunden. Der geringe Anteil der Blut-Lymphozyten und der Kernschatten änderte sich in diesem Zeitraum kaum.

Die meisten Untersucher sehen einen Zusammenhang zwischen der peripheren Leukozytenzahl und der Transformationsfähigkeit der Lymphozyten (11,12,23,26,40,48). Eine einheitliche Meinung über einen bestimmten Grenzwert gibt es jedoch nicht. So beschreibt ELVES (23) die Transformation als gut bei WBC unter 18.000/mm^3. SCHREK (48) sieht eine eindeutig niedrige Transformation über 100.000/mm^3, bei den darunter liegenden Werten findet er keinen Zusammenhang. GROPP (26) findet "einen deutlichen Unterschied zwischen den Fällen mit hohen Leukozytenzahlen, deren Transformationsrate ziemlich niedrig ist, und Fällen mit niedrigen Leukozytenzahlen, deren Transformationsrate relativ hoch ist". ASTALDI (2,3) sieht keinen Zusammenhang.

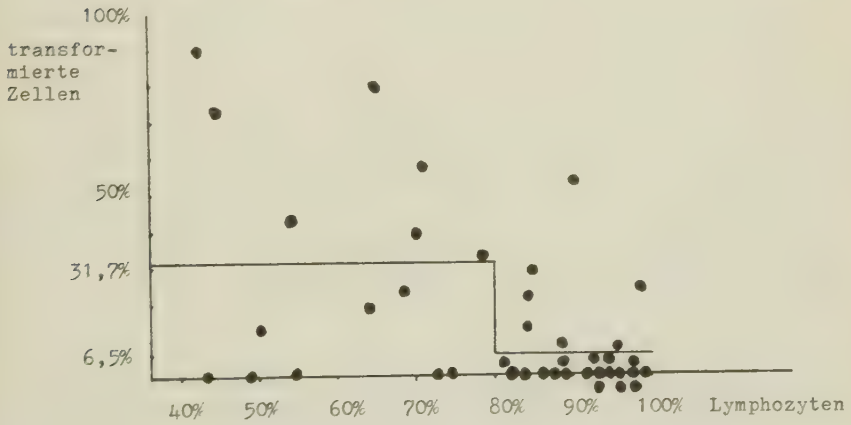
Tab. 7 Zusammenhang zwischen der Anzahl der peripheren Blutleukozyten und der Anzahl transformierter Zellen ($^+$ 21.300/mm^3)

		% transformierte Zellen						
		0	1-19	20-39	40-59	60-79	80-100	total
Leukozyten	weniger als 10.000	2			2	1	1	6
	10.000-29.000	5	2	3	2		1$^+$	13
	30.000-99.000	11	3	3				17
	100.000 u.m.	3	3					6

Aus der Tabelle 7 ist der Zusammenhang zwischen der Anzahl der peripheren Blutleukozyten und der Anzahl transformierter Zellen zu ersehen. Die hohen Transformationsraten liegen bei Leukozytenwerten unter 10.000/mm^3, während darüber die Stimulierung deutlich vermindert ist. Für die erste Gruppe ergibt sich somit ein Durchschnittswert von 46%, für die Mitosen 2,3%. Der Durchschnittswert für die zweite Gruppe ist 9%. Mitosen traten nicht auf.

Der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Lymphozyten im peripheren Blut und der Anzahl der transformierten Zellen ist aus der Abbildung 7 und der Tabelle 8 zu sehen. Dabei zeigen sich hohe Transformationsquoten sowohl bei niedrigen (45%), als auch bei hohen (98%) Lymphozytenanteilen. Bei den absoluten Lymphozytenwerten/mm^3 ist ein Grenzwert bei 15.000 Lymphozyten/mm^3 zu finden. Nur bei darunter liegenden Lymphozytenzahlen sind hohe Transformationsquoten zu finden.

Abb. 7 Anzahl der transformierten Zellen in Abhängigkeit von der Prozentzahl der Lymphozyten im Blut (die eingetragene Linie entspricht den Mittelwerten)



Tab. 8 Prozentzahl der transformierten Zellen in Abhängigkeit von der Prozentzahl der Lymphozyten im Blut

	% transformierte Zellen						
% Lymphozyten/mm^3	0	1-19	20-39	40-59	60-79	80-100	total
40 - 59%	3	1		1	1	1	7
60 - 79%	2		3	2		1	8
80 - 100%	16	7	3	1			27

Eine wesentlich niedrigere Transformation war zu beobachten bei der Gruppe von Patienten, bei der der Anteil der Lymphozyten im peripheren Blut 80-100 % betrug. Den 6,5 % Blasten dieser Gruppe standen 31,7 % der Gruppe gegenüber, die nur 40-80 % Lymphozyten in ihrem Blut hatten. Über 90 % Lymphozyten waren gleichbedeutend mit einer mittleren Transformationsrate von 3 %. Eine Ausnahme bildete Kultur 18, die mit 90 % Lymphozyten eine nennenswerte Transformation zeigte (54%). Die Leukozytenzahl war zum gleichen Zeitpunkt 3.800/mm^3.

Welche Rolle in diesem Zusammenhang die Milz spielt, kann man an folgender Feststellung ermessen: Während bei der Gruppe von Patienten, die 40-80 % Lymphozyten im Differentialblutbild hatten, die Milz nur in 3 von 15 Fällen (20%) vergrößert war, fand sich eine Milzvergrößerung bei einem Lymphozytenanteil über 80 % in 72 % der Fälle. Eine Größenzunahme der Milz korreliert somit mit einem höheren Prozentsatz der Lymphozyten im peripheren Blut und einer niedrigen Transformationsrate. Mit anderen Worten: Die vergrößerte Milz bildet in verstärktem Maße immunologisch-inkompetente Lymphozyten, was aus der verminderten Stimulierbarkeit dieser Zellen hervorgeht.

Untersucht man den Zusammenhang zwischen der absoluten Zahl der Lymphozyten/mm^3 und der Stimulierbarkeit der Lymphozyten, so ergibt sich, wie auch aus der Tabelle 9 ersichtlich, folgendes Ergebnis. Die mittlere Transformationsquote ist für die Patienten, die weniger

als 15.000 Lymphozyten/mm^3 haben, mit 32,6% deutlich höher als bei der vergleichbaren Gruppe mit darüberliegenden Lymphozytenwerten (7%).

Tab. 9 Anzahl der transformierten Zellen in Abhängigkeit von der absoluten Anzahl der Lymphozyten/mm^3 Blut.

	% transformierte Zellen						
Lymphozyten/mm^3	0	1-19	20-39	40-59	60-79	80-100	total
weniger als 10.000	3	1		2	2	1	9
10.000 - 15.000	2		2			1	5
16.000 - 29.000	3	2	3	1			9
30.000 - 99.000	10	3	1				14
100.000 u.m.	3	2					5

In Bezug auf die Milz fand sich für die absoluten Lymphozytenzahlen/mm^3 Blut ein ähnliches Ergebnis wie für die prozentuale Lymphozytenzahl. Bei Lymphozytenzahlen unter 15.000/mm^3 fand sich eine Milzvergrößerung in 28,4% der Fälle, bei darüber liegenden Werten in 64% der Fälle.

Eine weitere Frage ist, welche Rolle in diesem Zusammenhang das Gammaglobulin spielt. Normale Lymphozyten bilden unter der durch PHA induzierten Transformation Gammaglobulin, das mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden konnte (9,25). Die CLL tendiert zu einer Verminderung der Serumproteine, insbesondere der Gammaglobuline als Ausdruck einer mangelhaften Bildung von Antikörpern (37,40). SCHREK's Ergebnisse (46) lassen vermuten, daß hypogammaglobulinämie bei CLL mit einer geringen Fähigkeit der Lymphozyten zur Transformation verbunden ist. Bei ELVES (23) hat der Patient mit der höchsten Transformation eine Hypergammaglobulinämie. In einer anderen Arbeit (22) findet er bei 6 Fällen von erworbener A-Gammaglobulinämie einen Abfall der Transformation. Er kommt zu der Schlußfolgerung (22), daß nur die

Lymphozyten von CLL-Fällen mit Hypogammaglobulinämie niedrige Prozentzahlen von Blasten in der Kultur mit PHA ergeben, während die Lymphozyten von CLL-Patienten mit normalem Gammaglobulin beinahe normale Blastenzahlen ergeben. ASTALDI (6) sieht keinen Zusammenhang.

Bei uns kann nur in 6 Versuchen eine Aussage über das Serum-Gammaglobulin gemacht werden. Von diesen waren zwei vermindert (12,55 und 8,2 rel.%) und eine erhöht. Bei den verminderten Gammaglobulinwerten blieb eine Transformation aus. 20% Blasten ergab die Kultur bei dem Patienten mit einer Hypergammaglobulinämie. Bei normalem Gammaglobulin ergaben die Kulturen 73,2% und einmal ein Ausbleiben der Transformation, also ein uneinheitliches Verhalten.

Ein wichtiges Kriterium bei der Unterscheidung von 2 Lymphozytenclonen (leukämische und nicht leukämische Zellen) ist die verschiedene Empfindlichkeit gegenüber Glukokorticoiden. Die stimulierten Zellen produzieren Gammaglobulin. Um die Theorie der immunologischen Antwort zu prüfen, wurde der Einfluß von Glukokorticoiden auf mit PHA kultivierte Lymphozyten geprüft (48). Der Effekt von Prednisolon wurde durch Incubation der Lymphozyten mit diesem Agens gefunden. Dabei wurde festgestellt, daß leukämische Lymphozyten empfindlicher gegenüber Prednisolon in Bezug auf ihre Stimulierbarkeit sind als normale Lymphozyten. So ergaben bei SCHREK (48) alle Versuche mit normalen Personen weniger als 60% Blasten, während der Effekt in 37 von 45 Fällen bei CLL über 60% Blasten ergab.
Patient f, der nach der Behandlung mit Cytostatica (Endoxan^{R}, Leukeran^{R}, Trenimon^{R}, Natulan^{R}) eine Transformationsrate von 54% (bei 16.000 Thrombozyten/mm^{3}) zeigte, wurde wegen der niedrigen Thrombozytenzahl mit Ultracorten^{R} (15-10mg) behandelt. Bei fast unveränderter Thrombozytenzahl sank die Transformationsrate auf 2%. Im gleichen Zeitraum waren die Blutleukozyten von 3.800 auf 70.000/mm^{3} angestiegen (bei 90% bzw. 94% Lymphozyten). In diesem Fall widerspricht das Ergebnis der sonstigen Tatsache, daß Glukokorticoide die Proliferation von Lymphozyten hemmen. Sie müssen in unserem Fall zu einer Zunahme von nicht transformationsfähigen Lymphozyten geführt haben, was die niedrige Transformationsrate von 2% erklärt. Die von SCHREK gefundene gute Stimulierbarkeit mit Prednisolon in der Kultur blieb demnach bei unserer Kultur, bei der der Pa-

tient mit Prednisolon (Ultracorten^{R}) behandelt worden war, aus.

Möglich ist weiterhin eine Untersuchung der Frage, in welchem Zusammenhang die Dauer der Krankheit und die Höhe der Transformation stehen. Keinen Zusammenhang fanden ASTALDI und SCHEURLEN (2,3,8,46). HEINE (31) fand, daß Frühformen der chronischen Lymphadenose eine bessere Stimulierbarkeit aufweisen als Spätformen. Unsere Ergebnisse sind in der Tabelle 10 zusammengetragen.

Tab. 10 Abhängigkeit der Transformierbarkeit von CLL-Lymphozyten von der Dauer der Krankheit

	% transformierte Zellen						
Krankheitsjahre	0	1-19	20-39	40-59	60-79	80-100	total
1 - 5	18	4	3	2			27
6 - 9	3	4		1		1	9
10 u.m.			3	1	1	1	6

Teilt man die Dauer der Krankheit in drei Gruppen, so ergibt sich für die kürzer erkrankten (1-5 und 6-9 Jahre) mit 10,4% bzw. 10,2% eine wesentlich niedrigere mittlere Transformationsquote als für die Gruppe, bei denen die Krankheit 10 Jahre und mehr bestand. Die für diese Gruppe bestimmte mittlere Transformationsrate von 47% erreicht beinahe die Transformation von Gesunden. Der Mittelwert der Mitosenindices lag bei 1,3%. Zurückgeführt werden kann die hohe Transformationsrate auf 6 Kulturen von 2 Patienten. Von diesen wurde ein Patient (h) nicht, der andere (o) seit einem Jahr vor der Kultur cytostatisch behandelt (Leukeran^{R} 12mg). Beiden gemeinsam ist eine beinah normale Leukozytenzahl (im Mittel 20.000/mm^{3}) und einem für Lymphadenosen verhältnismäßig niedrigem Anteil von Lymphozyten (63%). Beide gehören weiterhin zu der Gruppe von Lymphadenosen, die eine kaum bzw. nicht vergrößerte Milz hat. Das Gammaglobulin liegt bei Patient o mit 18,5 rel.% am oberen Rand der Norm. Aus diesen für eine CLL günstigen Werten läßt sich die

gute Stimulation herleiten, denn wie schon gesagt, ist bei niedriger Leukozytenzahl, niedrigem Lymphozytenanteil und bei nicht vergrößerter Milz die Wahrscheinlichkeit einer höheren Transformationsrate größer.

ZUSAMMENFASSUNG

Die in vitro Stimulierbarkeit der Lymphozyten durch Phytohämagglutinin ist bei chronisch lymphatischer Leukämie mit 15,8% im Mittel gegenüber derjenigen von gesunden Personen deutlich vermindert. Die meisten transformierten Zellen zeigten sich am dritten Kulturtag. Gesucht wurde ein Zusammenhang zwischen der Transformationsrate und klinischen Faktoren. Dabei wurden mit anderen Autoren übereinstimmende und differierende Zusammenhänge gefunden.
Kein Zweifel besteht in der Ansicht, daß in der Mehrheit der Fälle bei CLL eine Transformation ausbleibt, oder zumindest vermindert ist (in 34 von 42 Versuchen). Es treten aber immer wieder Fälle auf, bei denen die Transformation Werte wie bei Gesunden erreicht. In der vorliegenden Arbeit wird der Zusammenhang mit der Therapie, der Größe der Milz, der peripheren Leukozyten- und Lymphozytenzahl, der Gammaglobulinämie und der Krankheitsdauer dargestellt.

1.) AMBS,E.,CHESEBRO,J.,LAGERLÖF,B.: Zur Darstellung der Transformationsfähigkeit von Lymphozytenkulturen bei verschiedenen Erkrankungen mittels Feulgen-Zytophotometrie. Acta Hämat.41:276, 1969

2.) ASTALDI,G.,SAULI,S.,AIRO,R.,COSTA,G.: Effect of phytohemagglutinin on lymphocytes from different leukemias. Texas Reports on Biology and Medicine 23:569, 1965

3.) ASTALDI,G.,AIRO,R.,SAULI,S.: In vitro studies on leukaemic cells. Cambridge Univ. Press 1965

4.) ASTALDI,G.,AIRO,R.: Phytohaemagglutinin in leukaemia. Lancet 1103, 1966

5.) ASTALDI,G.,MASSIMO,L.,AIRO,R.,MORI,P.G.: Phytohaemagglutinin and lymphocytes from acute lymphocytic leukaemia. Lancet 1265, 1966

6.) ASTALDI,G.,COSTA,G.,AIRO,R.,DUATE,N.: Is the defective reaction to phytohaemagglutinin shown by the lymphocytes from lymphocytic leukaemia depending on their innate structure or on plasmatic characteristics? Reprint from Suppl. 445 of Acta Med. Scand. 1966

7.) ASTALDI,G.,AIRO,R.,COSTA,G.,DUATE,N.: Milzbestrahlung und immunologische Antwort peripherer Lymphozyten von chronisch-lymphatischen Leukämien. Blut 13:100, 1966

8.) ASTALDI,G.,AIRO,R.: Phytohaemagglutinin and human lymphocytes in short-term tissue culture. Estratto dal "Boll. Ist. Sieroter. Milanese" 45:5, 1966

9.) BACH,F.,HIRSCHHORN,K.: Gamma globulin production by human lymphocytes in vitro. Ann.N.Y.Acad.sci. 120:299, 1964

10.)BACH,F.,VOYNOW,N.K.: One-way stimulation in mixed leukocyte cultures. Science 153:545, 1966

11.)BERNARD,C.,GERALDES,A.,BOIRON,M.: Action de la phytohemagglutinine "in vitro" sur les lymphocytes de leucemies lymphoides chroniques. Nouv.Rev.Franc.dHemat. 4:69, 1964

12.)BERNARD,C.,GERALDES,A.,BOIRON,F.: Effects of phytohaemagglutinin on blood-cultures of chronic lymphocytic leukaemia. Lancet 667, 1964

13.)BOLL,I.: Bewegungsstudien an nicht stimulierten und stimulierten Lymphozyten sowie Retothelsarkomzellen. 2.Arbeitstagung über Leukozytenkulturen, Publikation der Verhandlungsberichte. Kettwig 1971

14.) BOURONCLE,B.A.,CLAUSEN,K.P.,ASCHENBRAND,J.F.: Studies of the delayed response of phytohaemagglutinin (PHA) stimulated lymphocytes in 25 chronic lymphatic leukemia patients before and during therapie. Blood 34:166, 1966

15.) CARSTAIRS,K.: The human small lymphocyte: its possible pluripotential quality. Lancet 1:829, 1962

16.) CLAUSEN,K.P.,BOURONCLE,B.A.: The ultrastructure of phytohemagglutinin (PHA) stimulated lymphocytes of chronic lymphatic leukemia. Blood 34:179, 1969

17.) COULSON,A.S.,CHALMES,D.G.: Effects of phytohaemagglutinin on leukocytes. Lancet 2:819, 1964

18.) COWLING,D.C.,QUAGLINO,D.: Effect of some antigens on leucocyte cultures. J.Path.Bact. 89:63, 1965

19.) DAMESHEK,W.: Chronic lymphocytic leukemia-an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. Blood 29:566, 1967

20.) ELVES,M.W.,WILKINSON,J.F.: Effects of phytohaemagglutinin on the morphology of cultured leucocytes. Nature 194:1257, 1962

21.) ELVES,M.W.,WILKINSON,J.F.: The effects of phytohaemagglutinin on normal and leukaemic leucocytes when cultured in vitro. Exp. Cell Res. 30:200, 1963

22.) ELVES,M.W.,ROATH,S.,ISRAELS,M.C.G.: Failure of lymphocytes from hypogammaglobulinaemic subjects to transform in culture. Brit. Med. J. 2:1051, 1964

23.) ELVES,M.W.,COLLINGE,M.,ISRAELS,M.C.G.: The potential of lymphocytes from patients with leukaemia and reticuloses to transform under the influence of phytohaemagglutinin. Acta haemat. 37:100, 1967

24.) EVERETT,N.B.,CAFFREY,R.W.,RIEKE,W.O.: Recirculation of lymphocytes. Ann.N.Y.Acad.Sci. 113:887, 1964

25.) FORBES,I.J.,HENDERSON,D.W.: Globulin synthesis by human peripheral lymphocytes. In vitro measurements using lymphocytes from normals and patients with diseases. Ann.intern.Med. 65:69, 1966

26.) GROPP,A.,KLEE,F.: Ergebnisse der Lymphozytenkultur in vitro bei Lymphadenosen. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie 53. Tagg., 1969

27.) GROPP,A.,FISCHER,R.: Untersuchungen zur Phytohämagglutinin-stimulierten Umwandlung von menschlichen Blutlymphozyten zu blastenartigen Zellen. Virchows Arch.path. Anat. 338:64, 1964

28.) HAVEMANN,K.,RUBIN,A.D.: The delayed response of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to phytohemagglutinin in vitro. Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 127:668, 1968

29.) HAVEMANN,K.: Die verzögerte lymphozytäre Reaktion auf Phytohaemagglutinin (PHA) in vitro bei malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems. 13.Tagg.Dt.Ges.Hämat.Ulm 1968 Seite 48

30.) HEINE,K.M.,STOBBE,H.,HOFER,E.,WEBER,H.: Lymphozytentransformationstest bei chronischer lymphatischer Leukose unter Berücksichtigung der absoluten Lymphozytenzahl im Blut. Acta haemat.41:144, 1969

31.) HEINE,K.M.,STOBBE,H.: Die Anwendbarkeit der Lymphozytenkultur als klinischer Funktionstest. Dt.Gesundh.Wes.22:1977, 1967

32.) HERSH,E.M.: Inhibition of in vitro lymphocyte transformation during chemotherapy in man. Cancer Res. 27:98, 1967

33.) HIRSCHHORN,K.,SCHREIBMAN,R.R.,BACH,F.H.,SILTZBACH,L.E.: In vitro studies of lymphocytes from patients with sarcoidosis and lymphoproliferative diseases. Lancet 842, 1964

34.) HOLM,G.,PERLMANN,P.,JOHANSSON,B.: Impaired phytohaemagglutinin-induced cytotoxicity in vitro of lymphocytes from patients with Hodgkins disease or chronic lymphatic leukaemia. Clin. exp.Immunol. 2:351, 1967

35.) HUNGERFORD,D.A.,DONELLY,A.Y.,NOWELL,P.C.,BECK,S.: The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. Amer.J.Hum. Genet. 2:215, 1959

36.) INMAN,D.R.,COOPER,E.H.: Electron microscopy of human lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. J.Cell Biol. 19:441, 1963

37.) LARSON,D.L.,TOMLISON,L.J.: Quantitative antibody studies in man. Antibody response in leukemia and other malignant lymphomata. J.clin.Invest. 32:317, 1963

38.) Mc.INTYRE,O.R.: The effect of phytohemagglutinin on leukocyte cultures as measured by p^{32}-incorporation in the DNA, RNA and acid soluble fractions. Blood 19:443, 1962

39.) NOWELL,P.C.: Phytohaemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20:462, 1960

40.) OPPENHEIM,J.J.,WHANG,G.,FREI,E.: Immunogic and cytogenetic studies of chronic lymphocytic leucemic cells. Blood 26:121, 1965

41.) OSGOOD,E.E.,TIVEY,H.,DAVIDSON,K.B.,SEAMAN,A.J.,LI,J.G.: The relative rates of formation of new leukocytes in patients with acute and chronic leukemias. Cancer 5:331, 1952

42.) PEARMAIN,G.,LYCETTE,R.R.,FITZGERALD,R.H.: Tuberculin induced mitosis in peripheral blood leucocytes. Lancet 1:637, 1963

43.) PÖSSNEROVA,V.,HERMANSKY,F.: The behavior of lymphocytes of chronic lymphadenoses in short-termed tissue cultures from peripheral blood. Neoplasma 13:417, 1966

44.) QUAGLINO,D.,COWLING,D.C.: Cytochemical studies on cells from chronic lymphocytic leukaemia and lymphosarcoma cultured with Phytohaemagglutinin. Brit.J.Haemat. 10:358, 1964

45.) RABINOWITZ,Y.,DIETZ,A.A.: Effect of phytohemagglutinin on the lactate dehydrogenases of lymphocytes from chronic lymphatic leukemia. Blood 31:166, 1968

46.) SCHEURLEN,P.G.,PAPPAS,A.,LUDWIG,T.: Stimulation der Blutlymphozyten durch Phytohämagglutinin bei chronischer Lymphadenose, Lymphosarkomatose und Lymphogranulomatose. Klin.Wschr. 46:483, 1968

47.) SCHREK,R.,RABINOWITZ,Y.: Effects of phytohemagglutinin on rat and normal and leukemic human blood cells. Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 113:191, 1963

48.) SCHREK,R.: Effect of phytohemagglutinin on lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. Arch.Path. 83:58, 1967

49.) SHARMAN,C.,CROSSEN,B.E.: Lymphocyte number and response to phytohaemagglutinin in chronic lymphocytic leukaemia. Scand. J.Haemat. 3:375, 1966

50.) TANAKA,Y.,EPSTEIN,L.B.,BRECHER,G.,STOHLMAN,F.: Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood. Blood 22:614, 1963

51.) TRUBOWITZ,S.,MASEK,B.,DEL ROSARIO,A.: Lymphocyte response to phytohemagglutinin in Hodgkins disease, lymphatic leukemia and lymphosarcoma. Cancer 19:2019, 1966

52.) WINTER,G.C.B.,OSMOND,D.G.,YOFFEY,J.M.,MAHY,D.J.: Leucocyte cultures with phytohaemagglutinin in chronic lymphatic leukaemia. Lancet 563, 1964

53.) WUTTKE,H.,WUTTKE-GÖRNANDT,I.,HAFERKAMP,O.: Zur quantitativen Funktionsanalyse eines im Blutplasma an Tuberkulose erkrankter Patienten nachweisbaren Hemmfaktors für die in der Zellkultur nach Tuberkulinzusatz auftretende Lymphozytentransformation. Klin.Wschr. 46:716, 1968

54.) YOFFEY,J.M.,WINTER,G.C.B.,OSMOND,D.G.,MEEK,E.S.: Morphological studies in the culture of human leucocytes with phytohaemagglutinin. Brit.J.Haemat. 11:488, 1965